

04



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Off nl gungsschrift**
⑩ **DE 199 30 512 A 1**

⑤① Int. Cl. 7:
C 07 K 16/00
C 07 K 14/005
C 07 K 14/435

②① Aktenzeichen: 199 30 512.9
②② Anmeldetag: 5. 7. 1999
④③ Offenlegungstag: 11. 1. 2001

⑦① Anmelder:
Brüß, Michael, Dr., 53121 Bonn, DE; Bönisch, Heinz,
Prof. Dr., 53125 Bonn, DE

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen
⑤④ NFORMYL: gen, cDNA, Expression und Aminosäuresequenz

DE 199 30 512 A 1

Beschreibung

Mit Hilfe der Aminosäuresequenz eines G Protein gekoppelten Rezeptors wurde durch Homologiesuche in einer öffentlich zugänglichen Datenbank ein potentiell Gen für einen neuen G Protein gekoppelten Rezeptor auf dem humanen Chromosom 11 identifiziert. Aus der Gensequenz wurden Oligonukleotide zur Amplifikation des potentiellen Rezeptorgens und dessen abgeleiteter cDNA (mRNA) Sequenz hergestellt und für die PCR-Amplifikation des Gens und der cDNA eingesetzt. Mittels dieser Primer konnte das intronlose Gen aus humaner genomischer DNA kloniert und sequenziert werden.

Das zu patentierende Gen erstreckt sich über 3540 Basen. Der kodierende Bereich des Gens (Pos. 575 bis 1984) besteht aus einem offenem Leseraster von 1410 Basen und kodiert somit ein Protein von 470 Aminosäuren. Hydrophobizitätsanalyse der Aminosäuresequenz ergibt, daß es sich um einen G Protein gekoppelten Rezeptor mit wahrscheinlich sieben transmembranalen Domänen handelt. Die Aminosäuresequenz ist neu und bisher unbekannt und weist die besten Homologien (27% Identität; 47% Homologie) zu einem humanen N-formyl Peptid-Rezeptor und zu einem Anaphylatoxin C3a Rezeptor der Ratte (33% Identität; 47% Homologie) auf.

Weiterhin gehören zu der zu patentierenden Sequenz 574 Basen des 5' nichttranslatierten Bereichs des Gens, welche vermutlich den Promotor enthalten, sowie 1556 Basen des 3' nichttranslatierten Bereichs des Gens, welche ein fast klassisches Polyadenylierungssignal in Position 3092 bis 3096 enthalten.

Das Gen wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Primern (sense: 5' CCGTGTCCAGCAGGACTCTG 3'; antisense: 5' GGCTCTTTCACTGCTCTGGTG 3'), welche die kodierende Region des Gens flankieren amplifiziert. Dazu wurde folgendes Temperaturprogramm für die PCR verwendet: 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 3 min, 37 Zyklen. Wir konnten so die volle kodierende cDNA (offenes Leseraster) dieses Rezeptors aus genomischer DNA amplifizieren. Weiterhin konnte durch Homologiesuche in Datenbanken von exprimierten Sequenzstücken humaner Gene (EST = expressed sequence tags) eine exprimierte Sequenz (EST AI284640) aus einer Brustkrebs cDNA Bank identifiziert werden, die fast identisch mit dem 3' Bereich des Gens ist. Weitere EST mit sehr hoher Homologie (größer 90%) wurden in folgenden Geweben gefunden: AI0S3445: humaner Eierstock Tumor; AI569060: humaner Pankreas; AI431303: humane Aorta; AI334443: humane Lunge; AI613280: humaner Uterus; AI434695: humane Lymphknoten.

Die von der cDNA Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des Rezeptors ist 470 Aminosäuren lang. Hydrophobizitätsanalyse der Aminosäuresequenz ergibt eine putative Sekundärstruktur des Proteins als integrales Membranprotein mit wahrscheinlich sieben transmembranalen Domänen. Das Protein enthält eine potentielle Tyrosin-Sulfatierungsstelle im N-terminalen Bereich (Aminosäure 26). Weiterhin ist in der Aminosäuresequenz eine potentielle Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen (Aminosäure Positionen 192) enthalten, deren fakultative Phosphorylierung (sofern sie intrazellulär lokalisiert sind) an der Modulation der Rezeptorfunktion beteiligt sein können. In der Aminosäuresequenz befinden sich neun potentielle Caseinkinase II Phosphorylierungsstellen (Aminosäuren: 3, 18, 326, 332, 340, 350, 424, 451 und 459). Potentielle N-Myristoylierungsstellen befinden sich in Aminosäurepositionen 29, 43, 63, 100 und 112. Weiterhin befindet sich in Position 220 bis 225 der Aminosäuresequenz eine typische Cytochrom C-Häm-Bindungsdomäne.

Einordnung und potentielle Funktionen des zu patentierenden Rezeptors und seines Gens (bzw. cDNA; mRNA).

Der neue Rezeptor ("NFORMYL"-Rezeptor) gehört zur großen Genfamilie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Aufgrund der Verwandtschaft mit bereits bekannten Rezeptoren dieser Rezeptorfamilie (FMLP-Rezeptoren) sind folgende Eigenschaften sehr wahrscheinlich:

- Expression in Zellen des Immunsystems (z. B. Neutrophile, Phagocyten, Leukozyten, Granulozyten, Lymphknoten-Zellen).
- Beteiligung an pathophysiologischen Vorgängen (z. B. Phagocytose, Chemotaxis) im Rahmen allergischer Reaktionen, Immunprozessen, Sepsis. Komplementaktivierung und Entzündungen (z. B. bei Magenschleimhautentzündungen, cystischer Fibrose, Colitis ulcerosa, Periodontitis).
- Beteiligung an pathophysiologischen Vorgängen bei chronischer myeloischer Leukämie, der Sekretion von Tumornekrosefaktor und Interleukinen (z. B. IL-1, IL-6, IL-8).
- Rezeptor-Aktivierung durch Leukotriene/Eicosanoide, Lipoxin A und wahrscheinlich auch durch Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Interferon-Gamma.
- Beteiligung an Bildung von Sauerstoffradikalen und damit wahrscheinlich involviert in atherosklerotische Vorgänge.
- Expression in glatten Muskelzellen (z. B. Coronar-Arterien, Aorta, Uterus, Bronchien/Lunge) und damit wahrscheinlich beteiligt an Kontraktionsvorgängen (z. B. Venenerkrankungen, veränderte vaskuläre Reaktivität beim "Barter's Syndrom").
- Expression in Pankreas- und Leberzellen (vermutlich auch in der Hepatom-Zelllinie HepG2): möglicherweise sind Rezeptor-vermittelte Vorgänge (oder die mRNA) an der akuten Regulation hepatischer Gene beteiligt.
- Expression auch im Eierstock (Rezeptor für Choriogonadotropin?) und Mucosa.
- Rezeptoraktivierung vermutlich durch N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin, ähnliche Peptide oder eine Reihe von chemotaktischen Faktoren (z. B. C5a, MCP-1, PAF, Interleukine).
- Rezeptorexpression wird möglicherweise durch Ciclosporin gehemmt.

DE 199 30 512 A 1

MBHB-Rezept-3

1	MDTTMEADLG	ATGHRPTEL	DDEDSYPOGG	WDTVFLVALL	LLGLPANGLM	AWLAGSQARH
61	GAGTRLALLL	LSLALSDFLF	LAAAAFQILE	IRHGGHWPLG	TAACRFYYFL	WGVSYSSGLF
121	LLAALSLDRC	LLALCPHWYP	GHRPVRLPLW	VCAGVWVLAT	LFSVPWLVEP	EAAVWWYDLV
181	ICLDFWDSEE	LSLRMLEVLG	GFLPFLLLLV	CHVLTQATAC	RTCHRQQQPA	ACRGFARVAR
241	TILSAYVVL	LPYQLAQLLY	LAFLWDVYSG	YLLWEALVYS	DYLILLNSCL	SPFLCLMASA
301	DLRTLRLSVL	SSFAAALCEE	RPGSFTPTPE	QTOLDSEGPT	LPEPMAEAQS	QMDPVAQPQV
361	NPTLQPRSDP	TAQPQLNPTA	QPQSDPTAQP	QLNLMAQPQS	DSVAQPQADT	NVQTPAPAAS
421	SVPSPCDEAS	PTPSSHPTPG	ALEDPATPPA	SEGESPSSTP	PEAAPGAGPT	

5

10

N-FORMYL-Rezeptor: 470 Aminosäuren

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5'

MBHB-Rezept-3

CTGTCTGGAC AGTGTCTCAT GCCTGTAATC TCAACATTTT AGGAGGCCAA GGTAGGAGGA
 TCACTTGAGC TCACGAGTTC AAGACCAGCC TGGGCAACAC AGTGAGACCT TGTTTCTACT
 5 AAAAAATTTAA AAAGTAGTGG GTGCACACCT GTAGTCCCAG CTACTAGGGA GGCTGAGATG
 GGAGGGTCCG TGGAAACCCAG GAGGTGGAAG CTGCAGGGAC TGTGCCACTG CACTCATCCT
 GGGCAATAGA GCAAGGCCCT GTCTCTCAAA AAAAAAAAAA AGAAAAGAAA AGAAAAGTCT
 GGGTTGAGCC CTGGCACCTC CTTTCTTACC TTCACTGATT CTCTGAACCT TCCTGTCTCT
 10 GCCTGTAAAG TAGATTGTAT GAGGACTCCA TGAGGTCATC CACTTCAAGT CTTTGGCATA
 GGATAATTAC TCAAAAGGTG ATGACAATGG CGCAGGGAGG GATGGTGACT TGCCTGGAGA
 TGCACAGCAC CGTCTCTCCC ATACTCGGTG ATTCACACCA TCATTGATTG ACCAGGCACC
 CACTCCGTGT CCAGCAGGAC TCTGGGGACC CCAAATGGAC ACTACCATGG AAGCTGACCT
 GGGTGCCACT GGCCACAGGC CCCGCACAGA CTTTGATGAT GAGGACTCCT ACCCCCAAGG
 15 TGGCTGGGAC ACGGTCTTCC TGGTGGCCCT GCTGCTCCTT GGGCTGCCAG CCAATGGGTT
 GATGGCGTGG CTGGCCGGCT CCCAGGCCCG GCATGGAGCT GGCACGCGTC TGGCGCTGCT
 CCTGCTCAGC CTGGCCCTCT CTGACTTCTT GTTCTCTGGA GCAGCGGCCCT TCCAGATCCT
 AGAGATCCGG CATGGGGGAC ACTGGCCGCT GGGGACAGCT GCCTGCCGCT TCTACTACTT
 CCTATGGGGC GTGTCTTACT CCTCCGGCCT CTTCTGTCTG GCCGCCCTCA GCCTCGACCG
 20 CTGCCCTGCTG GCGCTGTGCC CACACTGGTA CCCTGGGCAC CGCCAGTCC CGCTGCCCTT
 CTGGGTCTGC GCGGTGTCT GCGGTGTGCT CACACTCTTC AGCGTGCCCT GGCTGGTCTT
 CCCCAGGGCT GCCGTCTGGT GGTACGACCT GGTCTCTGCT CTGGACTTCT GGGACAGCGA
 GGAGCTGTGC CTGAGGATGC TGGAGGTCTT GGGGGGCTTC CTGCCTTTCC TCCTGTCTGCT
 CGTCTGCCAC GTGCTCACCC AGGCCACAGC CTGTGCGACC TGCCACCGCC AACAGCAGCC
 25 CGCAGCCTGC CGGGGCTTCG CCCGTGTGGC CAGGACCATT CTGTGAGCTT ATGTGGTCTT
 GAGGCTGCCC TACCAGCTGG CCCAGCTGCT CTACCTGGCC TTCCTGTGGG ACGTCTACTC
 TGGCTACCTG CTCTGGGAGG CTTCTGGTCTA CTCCGACTAC CTGATCTTAC TCAACAGCTG
 CCTCAGCCCC TTCCTCTGCC TCATGGCCAG TGCCGACCTC CGGACCCTGC TGCCTCCGT
 GCTCTCGTCC TTCGCGGCAG CTCTCTGCGA GGAGCGGCCG GGCAGCTTCA CGCCCACTGA
 30 GCCACAGACC CAGCTAGATT CTGAGGGTCC AACTCTGCCA GAGCCGATGG CAGAGGCCCA
 GTCACAGATG GATCCTGTGG CCCAGCCTCA GGTGAACCCC AACTCCAGC CACGATCGGA
 TCCCACAGCT CAGCCACAGC TGAACCCCTAC GGCCAGCCA CAGTCGGATC CCACAGCCCA
 GCCACAGCTG AACCTCATGG CCCAGCCACA GTCAGATTCT GTGGCCAGC CACAGGCAGA
 CACTAACGTC CAGACCCCTG CACCTGTCTG CAGTTCTGTG CCCAGTCCCT GTGATGAAGC
 35 TTCCCAACCC CCATCCTCGC ATCCTACCCC AGGGGCCCTT GAGGACCCAG CCACACCTCC
 TGCCCTGAA GGAGAAAGCC CCAGCAGCAC CCCGCCAGAG GCGGCCCGG GCGAGGCCCC
 CACGTGAGGG TCCAGGAACA CAGTCCAGAC AGGTGGGGAG CCGCCGACAG CTTTGTCTT AAAAAACCTG
 GAGGAACCCAG CCAGTCAGAC AGGTGGGGAG GAGGGAGGGG AAACAATCCA GCCAGAAGTC
 40 CTGAGTCCGT CAGGCCCTGA AGGAGGACTT GAGGGAGGGG AGCCTTTTCT GTGGTTGCTC
 TCAGGCAGTT CCATGTCAGC GACCCCTGCT CCCGGCCATC CAAACCGCAG CTAATGGCAT CTTGCGGGGT
 CCAACACACA CACAGTCGCC CGACAGCCCC ACTTCTTCC CTGGGCTTCA GTCCTGCTGG
 ACTGTCCCTC AACACCCAG ACCCCGCTGA CTTGACCTGA CCTCCCTTTG GTCCTTCCCT
 AGGAAGACAA CAGGGGGCAC TTTCCCGGG GACACAAGG ACGTGAAACA AAAAAGTCCC TGAAGAGAAG
 45 CCGTCTCCTC CTCCGGGCCT GGACACAAGG AGCCCAAGC AGGAGCCTAA GGCCCTGGTG AACCACAAGC
 GGGGCCCTCC AGGAGCCACC AGCCCAAGC GTCCCTTCC CCAACAGTC ATTGAGGCTG
 TGGCCTGGCA TGGCCAAGCC TGGTCCACTA GTCCCTTCC CCAACAGTC GCTGCGTAGC CTGGATTCAA
 GGGCAGGGCC TCCCTCAGCA AGGCGCCAGA AGAGGCAAGA GCAACTTCAC CTTCCGAGCT
 50 ATCCAGCTCT GCCATGTCCC AGCTGAGCGA CTCTGGAGGA TGTAAGGCAT TACAAGAGCC
 CCGGTGTCAT CAGCTGTTGA GAGGATGCAA TAAGAAAGTG TTCATCCACA TACAGGATGT
 TGGCGCACGC AGGGGCCCTG TGAAGTAGCC TTTCTTCTCC TTCATCCACA TACAGGATGT
 CCCTTTAGAG GCTGGGGATG GATAGAGGAG GCAGTGGGGA GAGCCACCAC CTGGCCAGG
 CATCTGGGAT CTTGTGACCT GTCTGGGCCG TAGACACCCA GGTGGCCTAA GACCAGGAGG
 CCGCCTCTGT GCCTTGGGGG CTTGCAAGT CTGATTCTAT TTAAAGTTT TTAAGTTT
 55 AATTAGCATC CACCTGCTCC CCACTCCCG TGGAGGGCTG CACAAGATT TTTGTGGGGG
 CTGCAGGTAC AGAGGGCCCC GATCCTGCCT GAATAACAGC CTCCCTCTGT CTGAGCCCAA
 GTGCACAGAT AGGAAGTTGT CCAAGCACAC AGAGCTCAGG GCACCAAGTG GTCTAGGAAG
 GGCAAGGGCA AAGACGGCCG GCGCGGTGG CTCACGCCTG TAATCCCAGC ACTTTGGGAG
 GCCGAGGCGG GCGGATCACA AGGTCAAAAG ATCAAGACCA TCCTGGCCAA CATGGTGAAA
 60 CCCCCTCTCT ATTAAGTA CAAAAATTAG CTGGGCGTAG CCGCGCACAC CTGTAATCCC
 AGCTACTCGG GAGGCTGAGG GAGGTAATTT GCTTGAACCC GGGAGGCAGA GGTGTCAGTG
 AGCCGGGATT GTACCACTGC ACTCCAGCCT GGCGACAGAG CAAGACTCCA TCTCAAAAAA
 AAAAAAAAAA ATTAGAAAGG GCAAAGGCTC CCAGAGGTCA CACAGCTTCT CTAGGGCAGA

65

N-FORMYL-Gen: 3540 Basen

3'

Dieses Patent soll sich erstrecken auf folgende Daten, Techniken und Anwendungen und Entwicklungen:

1. Das dargestellte Gen inclusive des 5' und 3' nichttranslatierten Bereichs
2. Transkriptionsfaktoren, RNA Polymerasen und Pharmaka sowie Chemikalien die die Expression des Gens in positiver oder negativer Weise beeinflussen. 5
3. Die von dem Gen transkribierte messenger RNA inclusive davon abgeleitete Spleißvarianten und Isoformen.
4. Die von der mRNA oder von dem intronlosen Gen abgeleitete cDNA.
5. Das von der mRNA (oder dem Gen oder der cDNA) abgeleitete oder hergestellte Protein. 10
6. Antikörper oder Antiseren, welche gegen einzelne oder mehrere Epitope des Proteins oder gegen das ganze Protein hergestellt werden.
7. Monoklonale Antikörper oder Antiseren die gegen einzelne oder mehrere Epitope des Proteins oder gegen das ganze Protein hergestellt werden.
8. Expressionssysteme (eukaryotische Zelllinien, Hefezellen, Xenopus Oocyten, Baculovirussysteme, bakterielle Expressionssysteme), welche das genannte Protein exprimieren (nativ oder recombinant). 15
9. Ligand Bindungsstudien und Screening assays an nativen oder recombinanten Rezeptoren oder Zellen oder Zellmembranen, welche diesen Rezeptor enthalten.
10. Transgene Tiere und knock out Tiere, welche diesen Rezeptor in veränderter Dichte oder gar nicht exprimieren. 20
11. Methoden der Gentherapie, welche sich auf diesen Rezeptor bzw sein Gen oder seine mRNA (cDNA) erstrecken und deren Entwicklung und Anwendung.
12. Sense und Antisense Oligonukleotide, welche von diesem Gen abgeleitet wurden sowie deren Anwendung.
13. Die Diagnose und Behandlung von Krankheiten, die mit diesem Rezeptor in direkter oder indirekter Weise in Verbindung stehen. 25
14. Methoden zur Diagnose von Erkrankungen, die mit diesem Rezeptor (oder dessen Gen, mRNA) in direkter oder indirekter Weise in Verbindung stehen wie z. B. Hybridisierungstechniken, Sequenzierung, SSCP, RFLP, Northern Blot, Southern Blot, Western Blot, Expressions Arrays, Antikörper, Mutationsanalysen.
15. Die Benutzung der Informationen zur Entwicklung neuer Pharmaka, Verbindungen und Chemikalien und die Evaluierung vorhandener Pharmaka, Verbindungen und Chemikalien sowie zur Entwicklung neuer Technologien oder Evaluierung vorhandener Technologien. 30
16. Das Patent soll sich auch erstrecken auf die Punkte 1. bis 15. für modifizierte Proteine, und Gen, cDNA und mRNA Sequenzen (Aminosäureaustausche, Basenaustausche). 35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -